



TITLE:

Small molecule TCS21311 can replace BMP7 and facilitate cell proliferation in in vitro expansion culture of nephron progenitor cells(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Tsujimoto, Hiraku

CITATION:

Tsujimoto, Hiraku. Small molecule TCS21311 can replace BMP7 and facilitate cell proliferation in in vitro expansion culture of nephron progenitor cells. 京都大学, 2020, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2020-07-27

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22692>

RIGHT:

許諾条件により本文は2021-02-27に公開

京都大学	博士（ 医学 ）	氏名	辻本 啓
論文題目	Small molecule TCS21311 can replace BMP7 and facilitate cell proliferation in <i>in vitro</i> expansion culture of nephron progenitor cells. （低分子化合物TCS21311 はネフロン前駆細胞の <i>in vitro</i> 拡大培養において BMP7 を代替し細胞増殖を促進する）		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>【背景・目的】</p> <p>Six2 陽性のネフロン前駆細胞は、胎児期に存在し腎臓の最小機能単位であるネフロンの上皮構造すべてを派生させる前駆細胞である。そして、ネフロン前駆細胞の安定的な供給法の開発は腎臓再生研究の進展に大いに貢献することが期待される。これまでにマウスネフロン前駆細胞の <i>in vitro</i> 拡大培養法開発に関する数報の報告があるが、いずれも BMP7 を用いている。マウス胎仔腎臓において、Bmp7 によるネフロン前駆細胞の増殖・分化に Smad や Mapk 経路の関与が報告されているが、その作用機序の詳細は明らかではなく、ネフロン前駆細胞の拡大培養系における BMP7 の役割も不明である。また、BMP などの増殖因子は、高コストかつロット間の活性の差が大きいため、より低コストで安定した作用を発揮する低分子化合物を用いた拡大培養法の開発が望まれる。本研究では、ネフロン前駆細胞の拡大培養系において BMP 7 を代替する化合物の同定によって、BMP7 の作用機序の解明と拡大培養法を改良することを目的とした。</p> <p>【方法・結果】</p> <p>まず既報の Six2-GFP レポーターマウスを用いて、Six2 陽性のネフロン前駆細胞を分取し、既報の拡大培養系において維持培養を行った。そして、その維持培養系において BMP7 を除くことで、細胞増加が著しく低下することを確認した。次に化合物スクリーニングにより、BMP7 の代替となり同程度の細胞増加を示す化合物を同定することを試みた結果、JAK3 阻害剤の 1 つである低分子化合物 TCS21311 が他の JAK3 阻害剤より強い活性を有し、BMP7 を代替できることが判明した。また、既報の腎臓オルガノイド誘導条件で培養したところ、TCS21311 を用いて BMP7 を代替し拡大培養したマウスネフロン前駆細胞は、ネフロンへの分化能を維持していた。</p> <p>次にネフロン前駆細胞の拡大培養系において、BMP7 の有無で Jak3-Stat3 経路が変動しているかを調べるために、RNA シークエンスデータのパスウェイ解析を行ったところ、BMP7 のない条件で Stat3 経路が活性化されていることが判明した。さらに、リン酸化 Stat3 の解析により、ネフロン前駆細胞の拡大培養系において、BMP7 が Jak3-Stat3 経路を阻害していることを確認した。また、BMP7 がいない条件で、Stat3 のターゲット遺伝子である <i>Socs3</i> と <i>Smad7</i> の発現上昇を確認した。それらはTCS21311 の添加により、BMP7 がある条件と同程度まで低下した。さらに、他の JAK3 阻害剤と比較し TCS21311 が BMP7 の代替作用を強く示したことから、TCS21311 のターゲットが Jak3-Stat3 以外にも存在することが示唆されたため、既報の BMP7 の下流経路の関与を検討した。その結果、Smad1/5 のリン酸化は、BMP7 により増加していたが、TCS21311 により BMP7 がいない条件でも増加していたことから、TCS21311 のターゲットの一つとして Smad1/5 の関与が考えられた。一方、MAPK ファミリータンパク質のリン酸化は、BMP7 により一部増加していたが、TCS21311 の添加により増加することとはなかった。</p> <p>最後に、他のターゲット経路の関与が考えられたことから、既報の拡大培養系への TCS21311 の添加がネフロン前駆細胞の増殖を促進するかを検討したところ、TCS21311 の添加により、マウスネフロン前駆細胞の細胞数が増加した。さらに、ヒト iPS 細胞から分化誘導したネフロン前駆細胞の増殖も促進することが判明した。</p>			

【考察・結論】
以上の結果は、ネフロン前駆細胞の増殖における BMP7 の作用機序の解明につながり、再生医療開発、疾患モデル研究、創薬に向けてのネフロン前駆細胞の安定供給に貢献することが期待される。
（論文審査の結果の要旨）
ネフロン前駆細胞は、腎臓の最小機能単位であるネフロンの上皮構造すべてを派生させる前駆細胞であり、その安定供給は腎臓再生研究の進展に貢献することが期待される。これまでにマウスネフロン前駆細胞の <i>in vitro</i> 拡大培養に関する数報の報告があり、いずれも BMP7 を用いているが、その培養系における役割の詳細は不明であった。また、低分子化合物を用いた低コストかつ安定した拡大培養系の開発が望まれる。本研究では、ネフロン前駆細胞の拡大培養系における BMP 7 の代替化合物を同定し、BMP7 の作用機序の解明を目的とした。まず、化合物スクリーニングにより既報のネフロン前駆細胞の拡大培養系において、BMP7 の代替化合物として JAK3 阻害剤である TCS21311 を同定した。次に、RNA シークエンシングと Stat3 経路の解析を行ったところ、BMP7 が Jak3-Stat3 経路を抑制していることが判明した。既報の BMP7 の下流経路である Smad1/5 と MAPK 経路の解析では、TCS21311 の標的として Smad1/5 の関与も示唆された。さらに、既報の拡大培養系への TCS21311 の添加がマウス胎仔およびヒト iPS 細胞由来ネフロン前駆細胞の増殖も促進することが判明した。
以上の研究は、ネフロン前駆細胞の増殖における BMP7 の作用機序の解明とネフロン前駆細胞の安定供給に貢献し、腎臓再生研究の進展に寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、令和 2 年 7 月 2 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日 以降